

C₂-神经酰胺对小鼠 T 淋巴细胞 体外活化和增殖的影响

慕静静, 曾耀英, 黄秀艳, 赵晓慧

(暨南大学生命科学技术学院 组织移植与免疫中心, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 研究 C₂-神经酰胺(C₂-cer)对小鼠 T 细胞体外活化和增殖的影响, 并对其免疫调节作用进行初步探讨。方法: 分离小鼠淋巴结细胞, 加入刀豆蛋白 A(ConA)或佛波醇酯(PMA)和离子霉素(Ion)进行刺激, 以不同终浓度的 C₂-cer 与 T 细胞共培养。流式细胞术结合双色荧光抗体染色, 检测 T 细胞早期活化抗原 CD69 的表达; 用羧基荧光素二醋酸琥珀酰(CFDA-SE)染色结合流式细胞术, 并用 ModFit 软件分析 T 细胞增殖相关指数。结果: 终浓度为 25、50 和 75 $\mu\text{mol/L}$ 的 C₂-cer 可以显著抑制 ConA 诱导的 T 细胞 CD69 的表达, 由 ConA 组的 $(60.13 \pm 1.18)\%$, 分别降低为 $(54.56 \pm 1.14)\%$ 、 $(48.73 \pm 1.26)\%$ 和 $(27.09 \pm 1.07)\%$ ($P < 0.01$); CFDA-SE 染色结果显示, 各浓度 C₂-cer 对 ConA 诱导的小鼠淋巴细胞增殖, 具有明显的抑制作用, 增殖指数(PI)由 ConA 组的 (1.81 ± 0.25) , 分别降低为 (1.46 ± 0.01) 、 (1.25 ± 0.04) 和 (1.18 ± 0.03) ($P < 0.05$); 各浓度 C₂-cer 均可明显抑制 PMA + Ion 诱导的小鼠淋巴细胞增殖, 增殖指数(PI)由 PMA + Ion 组的 (1.47 ± 0.01) , 分别降低为 (1.27 ± 0.01) 、 (1.11 ± 0.01) 和 (1.05 ± 0.01) ($P < 0.05$)。结论: C₂-cer 能有效地抑制小鼠 T 细胞的体外活化和增殖。

[关键词] C₂-神经酰胺; 增殖; T 细胞活化; 流式细胞术

[中图分类号] R392.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)02-0133-06

Effects of C₂-ceramide on activation and proliferation of mouse T lymphocytes in vitro

MU Jing-jing, ZENG Yao-ying, HUANG Xiu-yan, ZHAO Xiao-hui

(Institute of Tissue Transplantation and Immunology, College of Life Science and Technology,
Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Aim:** To investigate the effects of C₂-ceramide on activation and proliferation of murine T lymphocytes, and to elucidate the mechanism of the immunosuppressive effect of C₂-cer. **Methods:** Lymphocytes were isolated from lymphoid nodes of mouse, and were stimulated with polyclonal activators ConA or PMA plus Ion, and then were co-cultured with C₂-cer of different final concentration. The expression of CD69 (the early marker of the activated T cells) on T lymphocytes were measured by flow cytometry combined with two colored monoclonal antibodies. While, the effect of C₂-cer on the proliferation of T lymphocytes in response to ConA or PMA plus Ion stimulation was determined by flow cytometry combined with carboxyl fluorescein-diacetate-succinimidyl ester (CFDA-SE) staining technology, and the proliferation index (PI) was analyzed by ModFit software. **Results:** C₂-cer (final concentration is 25, 50 and 75 $\mu\text{mol/L}$) can inhibit the expression of CD69 on activated T lymphocytes in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). The expression rate of CD69 on T cells in response to ConA was $(60.13 \pm 1.18)\%$. After

[收稿日期] 2008-11-18

[基金项目] “973”国家重大基础研究项目(2006CB504200, 2004CB720100); 广州市科技局科技攻关重点项目(2006Z-E0091); 生物化学与分子生物学广东省重点学科资助项目

[作者简介] 慕静静(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 免疫分子识别与疾病研究

通讯作者: 曾耀英, 男, 研究员, 博士生导师, Tel: 020-85226219; E-mail: tzengy@jnu.edu.cn

treatment with C_2 -cer, the expression rate of CD69 reduced to $(54.56 \pm 1.14)\%$, $(48.73 \pm 1.26)\%$ and $(27.09 \pm 1.07)\%$ respectively ($P < 0.01$); C_2 -cer can inhibit the proliferation of T lymphocytes stimulated by ConA at all experimental concentration. The proliferation index (PI) of T cells in ConA group is (1.81 ± 0.25) , and the PI value of T cells in C_2 -cer group is (1.46 ± 0.01) , (1.25 ± 0.04) and (1.18 ± 0.03) , respectively ($P < 0.05$); C_2 -cer can also inhibit the proliferation of T lymphocytes stimulated by PMA + Ion at all experimental concentration. The proliferation index (PI) of T cells in PMA + Ion group is (1.47 ± 0.01) , and the PI value of T cells in C_2 -cer group is (1.27 ± 0.01) , (1.11 ± 0.01) and (1.05 ± 0.01) , respectively ($P < 0.05$). **Conclusion:** C_2 -cer can effectively inhibit the activation and proliferation of mouse T lymphocytes in vitro.

[Key words] C_2 -ceramide; proliferation; T cell activation; flow cytometry (FCM)

神经酰胺 (ceramide, Cer) 即 N-脂酰鞘氨醇 (N-acetyl-sphingosine), 是由细胞膜神经鞘磷脂 (sphingomyelin) 水解产生的一种脂质分子。神经酰胺作为一类重要的脂质第二信使, 对细胞分化、增殖、凋亡及衰老等生命活动具有重要调节作用^[1-3]。 C_2 -神经酰胺 (C_2 -ceramide, C_2 -cer) 是具有膜渗透性的神经酰胺类似物。药理学研究表明, C_2 -cer 具有抗肿瘤、抗病毒等作用^[4-5]。目前对 C_2 -cer 的研究主要集中在抗肿瘤方面, 而其对免疫系统的调节作用, 尤其是对 T 细胞所介导的免疫应答的影响却鲜有报道。本研究通过分析 C_2 -cer 对 ConA 或者 PMA + Ion 刺激下的小鼠 T 细胞活化和增殖的影响, 评价其免疫效应并探讨其免疫作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 实验动物 清洁级 BALB/c 近交系小鼠, 雄性, 8 周龄, 体质量 (20 ± 2) g, 购自广东省实验动物中心, 许可证号: SCXK 粤 2006-0015。

(2) 主要试剂 C_2 -ceramide 购自美国 Calbiochem 公司; 佛波醇酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、离子霉素 (ionomycin, Ion)、刀豆蛋白 A (concanavalin, ConA)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)、二甲基亚砷 (DMSO)、L-谷氨酰胺、 β -二巯基乙醇均购自美国 Sigma 公司; 羧基荧光素双醋酸盐琥珀酰亚胺酯 (carboxyfluorescein diacetate succinimide ester, CFDA-SE) 购自美国 Molecular Probes 公司; Anti-mouse CD3-FITC (fluorescein isothiocyanate, 异硫氰酸荧光素)、Anti-mouse CD69-PE (phycoerythrin, 藻红蛋白) 购自美国 BD-PharMingen 公司; RPMI-1640、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco 公司。高速低温离心机为美国 Sigma 公司产品。流式细胞

仪 (FACSCalibur) 为美国 Becton Dickinson 公司产品; 酶标仪 (Model 3550) 为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.2 方法

(1) 淋巴细胞悬液的制备 将 BALB/c 小鼠断颈处死, 无菌分离双侧腋窝、锁骨下、腹股沟浅淋巴结和肠系膜淋巴结, 在含有 PBS 的无菌平皿中去除被膜, 于 200 目尼龙网研磨过滤, 收集细胞, PBS 离心 ($250 \times g$, 5 min) 洗涤细胞 2 次。

(2) C_2 -cer 对小鼠 T 细胞活化的影响 将 1.2 (1) 制得的淋巴细胞用含体积分数为 10% FBS 的 RPMI1640 完全培养基重悬, 并调整细胞密度为 $3 \times 10^9/L$, 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 190 μL 。分别设置对照组、ConA 组、ConA + C_2 -cer 25 $\mu mol/L$ 组、ConA + C_2 -cer 50 $\mu mol/L$ 组和 ConA + C_2 -cer 75 $\mu mol/L$ 组, 各组相应加入培养基或药物工作液 10 μL , 将每孔调整至 200 μL 体系。将培养板置于 37 $^{\circ}C$ 、体积分数为 5% CO_2 培养箱中孵育 4 h, 然后加入 ConA (终质量浓度为 5 mg/L), 继续培养 6 h 后收集细胞。PBS 离心 ($250 \times g$, 5 min) 洗涤细胞 2 次, 重悬于 50 μL PBS 中, 加入 Anti-mouse-CD3-FITC、Anti-mouse-CD69-PE mAb (加入量为 1 $\mu g/10^6$ 细胞), 混匀后室温避光染色 30 min, PBS 离心 ($250 \times g$, 5 min) 洗涤细胞 2 次, 立即上流式细胞仪检测。

(3) 淋巴细胞 CFDA-SE 染色 将 1.2 (1) 制得的淋巴细胞用 PBS 重悬, 并调整细胞密度为 $1 \times 10^{10}/L$, 加入 CFDA-SE 工作液 (终浓度为 1 $\mu mol/L$), 充分混匀, 于室温避光轻轻振荡 10 min^[6]。用等体积 RPMI-1640 培养液终止染色, 离心 ($250 \times g$, 5 min), 弃上清, 相同条件洗涤细胞 2 次。

(4) C_2 -cer 对 T 细胞增殖的影响 将 1.2 (3) 制得的淋巴细胞用 RPMI-1640 完全培养基重悬, 并调整细胞密度为 $3 \times 10^9/L$, 接种于 96 孔板, 每孔 190 μL 。分别设置对照组、诱导剂组 (ConA 或 PMA + Ion 组) 以及诱导剂 + 药物组 (C_2 -cer 终浓度分别为

25、50、75 $\mu\text{mol/L}$),每孔调整至200 μL 体系,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 培养箱中孵育4 h,然后加入ConA(终质量浓度为5 mg/L)或者PMA + Ion(PMA终浓度为 1×10^{-8} mol/L ,Ion终质量浓度为0.5 $\mu\text{g/mL}$),继续培养48 h后收集细胞,立即上流式细胞仪检测。

(5)流式细胞术分析 所有样品经FACSCalibur流式细胞仪及CELLQuest获取。每管细胞悬液样品检测 10^4 个细胞,所得数据用CELLQuest及ModFit^{LT}3.2软件进行分析。

(6)MTT法检测药物毒性作用 分别设置空白组(RPMI-1640完全培养基)、对照组(细胞悬液)、C₂-cer 25 $\mu\text{mol/L}$ 组、C₂-cer 50 $\mu\text{mol/L}$ 组和C₂-cer 75 $\mu\text{mol/L}$ 组,且每组设3个复孔。细胞密度和培养方法与1.2(2)相似,不加ConA。细胞培养48 h后,每孔加入20 μL MTT工作液(质量浓度为5 mg/mL),置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 培养箱中避光孵育4 h,离心(300 $\times g$,5 min),吸掉上清液体,每

孔加入100 μL DMSO,于振荡器上避光振荡10 min,酶标仪490 nm波长检测每孔的吸光度(A值),并计算细胞相对存活率。

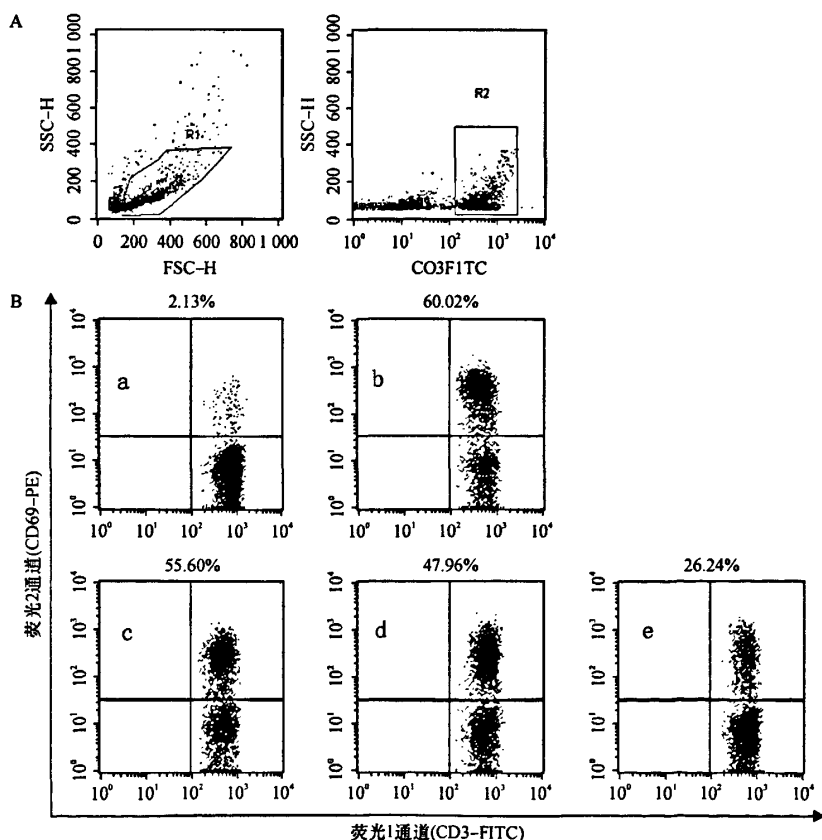
$$\text{细胞相对存活率} = [(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$$

(7)统计学处理 全部数据均使用Excel进行处理,数据以(均数 \pm 标准差)($\bar{x} \pm s$)表示,两组间的比较采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 C₂-cer对ConA诱导的小鼠T淋巴细胞CD69表达的影响

如图1所示,小鼠T淋巴细胞培养6 h后,对照组仅有极少数T细胞表达CD69,表达率为(2.12 \pm 0.04)%,而ConA组表达CD69的T细胞百分率显著增加,为(60.13 \pm 1.18)%,与对照组相比差异显著($P < 0.01$)。25、50、75 $\mu\text{mol/L}$ 的C₂-cer均能显著抑制ConA诱导的T细胞CD69分子的表达,其中以



A: T淋巴细胞; B: T细胞CD69表达率; a. 对照组; b. ConA组; c. ConA + C₂-cer (25 $\mu\text{mol/L}$); d. ConA + C₂-cer (50 $\mu\text{mol/L}$); e. ConA + C₂-cer (75 $\mu\text{mol/L}$)

图1 C₂-cer对ConA诱导T细胞表达CD69分子的流式图

75 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{C}_2\text{-cer}$ 的抑制率最强,表达 CD69 分子的 T 细胞百分率为 $(27.09 \pm 1.07)\%$,与 ConA 组相比差异显著($P < 0.01$,图 1,表 1)。

表 1 $\text{C}_2\text{-cer}$ 对 ConA 诱导 T 细胞表达 CD69 的抑制效应		
组别	例数	表达 CD69 的淋巴细胞占全部淋巴细胞的比例/%
对照组	3	2.12 ± 0.04
Con A	3	$60.13 \pm 1.18^{1)}$
ConA + $\text{C}_2\text{-cer}$ (25 $\mu\text{mol/L}$)	3	$54.56 \pm 1.14^{2)}$
ConA + $\text{C}_2\text{-cer}$ (50 $\mu\text{mol/L}$)	3	$48.73 \pm 1.26^{2)}$
ConA + $\text{C}_2\text{-cer}$ (75 $\mu\text{mol/L}$)	3	$27.09 \pm 1.07^{2)}$

1) 与空白对照组比较, $P < 0.01$; 2) 与 ConA 组比较, $P < 0.01$

2.2 $\text{C}_2\text{-cer}$ 对小鼠 T 淋巴细胞增殖的影响

CFDA-SE 染色后,在荧光 1 通道 (FL1) 中可检测出均一染色的细胞群,细胞分裂 1 次,其荧光强度倍减一半,故可动态追踪 T 细胞的增殖情况。用 ModFit^{LT}3.2 软件拟合后,得到增殖的 T 细胞各代的百分率及增殖指数 (PI)。对照组仅见 1 个亲代峰,无增殖峰,未出现 CFSE 荧光强度减弱。而在 ConA 或者 PMA + Ion 刺激下,CFSE 荧光强度减弱,出现子代细胞峰。加入 $\text{C}_2\text{-cer}$ 的药物组可明显减少 ConA 或者 PMA + Ion 组的分裂代数 and 子代细胞数量,并呈剂量依赖性 (图 2、3;表 2、3)。

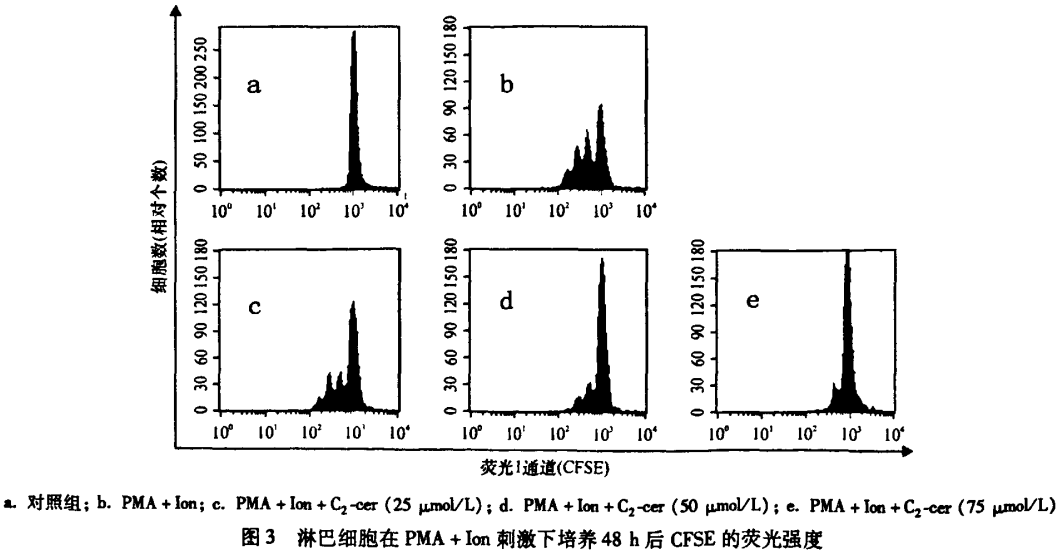
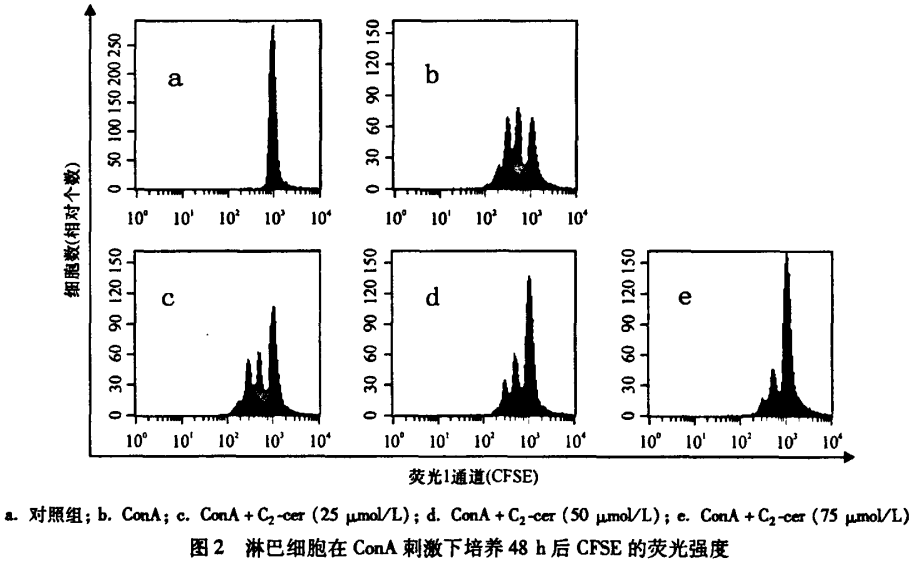


表 2 CFSE 染色分析 C₂-cer 对 ConA 诱导的小鼠 T 淋巴细胞($\bar{x} \pm s$)增殖的影响

组别	各代相应增值比例/%				增殖指数
	亲代(G1)	子一代(G2)	子二代(G3)	子三代(G4)	
对照组	99.29 ± 0.59	0.33 ± 0.14	—	—	1.00 ± 0.01
ConA	28.12 ± 0.71	38.31 ± 3.59	29.59 ± 2.10	3.84 ± 0.91	1.81 ± 0.25
ConA + C ₂ -cer(25 μmol/L)	48.53 ± 0.78 ²⁾	28.07 ± 1.26 ¹⁾	21.01 ± 0.83 ¹⁾	1.37 ± 0.18	1.46 ± 0.01 ²⁾
ConA + C ₂ -cer(50 μmol/L)	63.41 ± 3.62 ²⁾	29.81 ± 0.67 ¹⁾	6.59 ± 4.17 ¹⁾	—	1.25 ± 0.04 ²⁾
ConA + C ₂ -cer(75 μmol/L)	71.65 ± 2.84 ²⁾	22.52 ± 2.09 ¹⁾	2.92 ± 0.31 ¹⁾	—	1.18 ± 0.03 ²⁾

1) 与 ConA 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 ConA 组比较, $P < 0.01$

表 3 CFSE 染色分析 C₂-cer 对 PMA + Ion 诱导的小鼠 T 淋巴细胞($\bar{x} \pm s$)增殖的影响

组别	各代相应增值比例/%				增殖指数
	亲代(G1)	子一代(G2)	子二代(G3)	子三代(G4)	
对照组	99.53 ± 0.37	0.41 ± 0.39	—	—	1.00 ± 0.01
PMA + Ion(P + I)	48.17 ± 1.42	29.76 ± 0.21	20.67 ± 1.28	1.38 ± 0.36	1.47 ± 0.01
P + I + C ₂ -cer(25 μmol/L)	64.79 ± 0.71 ²⁾	21.42 ± 0.17 ²⁾	13.17 ± 0.66 ²⁾	0.61 ± 0.12 ¹⁾	1.27 ± 0.01 ²⁾
P + I + C ₂ -cer(50 μmol/L)	81.33 ± 1.51 ²⁾	16.25 ± 2.79 ¹⁾	2.27 ± 1.31 ²⁾	—	1.11 ± 0.01 ²⁾
P + I + C ₂ -cer(75 μmol/L)	89.48 ± 1.61 ²⁾	10.17 ± 1.51 ²⁾	—	—	1.05 ± 0.01 ²⁾

1) 与 P + I 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 P + I 组比较, $P < 0.01$

2.3 C₂-cer 对小鼠 T 淋巴细胞的药物毒性作用

如表 4 所示,小鼠 T 淋巴细胞培养 48 h 后,药物组细胞的相对存活率分别为 95.90%、91.23%、86.55%、77.78%,均可控制在 70% 以上,显示实验所设置的 3 个药物浓度均低于药物毒性致死剂量,药物毒性致死剂量定义为使其一半致死的药物剂量,可认为该药物在 25 ~ 100 μmol/L 范围内对细胞有一定毒性作用,但并不影响抑制细胞增殖所得实验数据的可靠性。

表 4 C₂-cer 对小鼠 T 淋巴细胞($\bar{x} \pm s$)的药物毒性影响

组别	例数	$\bar{x} \pm s$	存活率/%
空白组	3	0.079 ± 0.003	—
对照组	3	0.250 ± 0.007	100.00
加药组(25 μmol/L)	3	0.243 ± 0.010	95.90
加药组(50 μmol/L)	3	0.235 ± 0.008	91.23
加药组(75 μmol/L)	3	0.227 ± 0.007	86.55
加药组(100 μmol/L)	3	0.212 ± 0.010	77.78

3 讨论

神经酰胺是生物体内重要的第二信使,参与体内诸多生命活动,如阻滞细胞周期、抑制细胞生长及诱导细胞凋亡等。早期研究表明,来源于肿瘤细胞中的具更复杂结构的糖鞘脂类物质(glycosphingolipids)显示出免疫抑制活性^[7-9]。由此提示本研究探讨 C₂-cer 在调节免疫应答过程中的作用。T 淋巴细

胞是免疫系统中重要的免疫活性细胞,而 T 细胞的活化和增殖又是其发挥免疫活性的重要调控阶段,因此本研究分别采用了小鼠体外 T 淋巴细胞活化和增殖模型,分析 C₂-cer 对 ConA 或 PMA + Ion 刺激引起的 T 细胞活化和增殖作用的影响,结果发现 C₂-cer 可显著抑制 T 淋巴细胞的早期活化,并可明显抑制 ConA 或 PMA + Ion 刺激的 T 淋巴细胞增殖并呈剂量依赖关系。

ConA 是 T 细胞多克隆刺激剂,其刺激途径是非 Ca²⁺ 依赖性的。CD69 属于 Ca²⁺ 依赖性 II 型凝集素样超家族跨膜受体,在早期活化的 T 细胞表面可以大量表达。作为 T 细胞早期活化的表面分子,CD69 可与配体结合激活相关酪氨酸激酶,使胞内 Ca²⁺ 浓度上调,从而启动 T 细胞早期活化。C₂-cer 可使 TCR 表达下调,依赖于 C₂-cer 诱导的 Caspase 活化,并与 Caspase 介导的 TCR ξ 链的裂解有关^[10],据此推测 C₂-cer 对 ConA 刺激的 T 细胞活化的影响可能就是通过下调 TCR 的表达而实现的。另外,ConA 通过与 T 细胞表面的 TCR/CD3 复合体结合而诱发其活化及增殖反应,推测 C₂-cer 的抑制效应也可能是通过抑制 ConA 与 TCR/CD3 复合物的交联,从而抑制早期活化相关的蛋白酪氨酸激酶的活化,干扰了早期活化事件,进而抑制了 T 细胞增殖。

PMA + Ion 与 ConA 诱导细胞增殖的机制不同,其刺激途径是 Ca²⁺ 依赖性的。PMA 可通过细胞膜

进入胞内,模拟二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)的结构直接作用于蛋白激酶C(PKC)的调节部位,从而激活PKC;Ion是 Ca^{2+} 载体,可使细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,二者协同导致T细胞增殖。 $\text{C}_2\text{-cer}$ 可以阻断T细胞的 Ca^{2+} 通道,降低胞内 Ca^{2+} 水平^[11],可能阻碍了PKC的激活,阻滞了磷脂酶 $\text{C}\gamma 1$ (phospholipase $\text{C}\gamma 1$, $\text{PLC}\gamma 1$)- Ca^{2+} 依赖的活化途径,从而抑制PMA + Ion诱导的小鼠T细胞增殖。

根据目前 $\text{C}_2\text{-cer}$ 对肿瘤细胞作用的研究表明, $\text{C}_2\text{-cer}$ 主要通过阻滞细胞周期和诱导细胞凋亡而发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用^[12-13]。 $\text{C}_2\text{-cer}$ 抑制ConA或者PMA + Ion诱导的小鼠T细胞增殖,除了通过抑制T细胞活化外,阻滞T细胞周期和诱导T细胞凋亡也是其发挥作用的可能机制。

本研究证明 C_2 -神经酰胺可显著抑制小鼠T细胞体外活化和增殖,为将其开发成为免疫抑制药物提供了实验依据。而T细胞活化和增殖是一个复杂的动态过程,涉及多种细胞表面受体,酶和信号转导途径,对 C_2 -神经酰胺免疫抑制作用的具体位点及机制仍待进一步研究。

[参考文献]

- [1] TOMOMI D, SUSSMU M, YASUYUKI I. Ceramide kinase expression is altered during macrophage-like cell differentiation of the leukemia cell line HL-60 [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2007, 43 (10):321 - 323.
- [2] MACRAE V E, BURDON T, AHMED S F, et al. Ceramide inhibition of chondrocyte proliferation and bone growth is IGF-I independent [J]. *Journal of Endocrinology*, 2006, 191(2):369 - 377.
- [3] VENABLE M E, WEBB-FROELICH L M, SLOAN E F, et al. Shift in sphingolipid metabolism leads to an accumulation of ceramide in senescence [J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2006, 127(5):473 - 480.
- [4] ARUNA S, JAISWAL S N. Reduced levels of the adenomatous polyposis coli (APC) protein are associated with ceramide-induced apoptosis of colon cancer cells [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004, 130(12):695 - 703.
- [5] XIANG L, ELOJEIMY S, EL-ZAWAHRY A M, et al. Modulation of ceramide metabolism enhances viral protein apoptin's cytotoxicity in prostate cancer [J]. *Molecular Therapy*, 2006, 14(5):637 - 646.
- [6] 肇静娴, 曾耀英, 何贤辉, 等. 活体染料CFDA-SE在淋巴细胞增殖研究中的应用 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2003, 19(2):109 - 111.
- [7] IRANI D N, LIN K I, GRIFFIN D E. Brain-derived gangliosides regulate the cytokine production and proliferation of activated T cells [J]. *The Journal of Immunology*, 1996, 157(10):4333 - 4340.
- [8] GALINA V S, MICHAEL R S, SVETLANA B, et al. Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function [J]. *Cancer Research*, 2001, 61 (1):363 - 369.
- [9] PERSAT F, VINCENT C, SCHMITT D, et al. Inhibition of human peripheral blood mononuclear cell proliferative response by glycosphingolipids from metacestodes of *Echinococcus multilocularis* [J]. *Infect Immun*, 1996, 64 (9):3682 - 3687.
- [10] MENNÉ C, LAURITSEN J P H, DIETRICH J, et al. T-cell receptor downregulation by ceramide-induced caspase activation and cleavage of the ζ Chain [J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2001, 53(2):176 - 183.
- [11] ALBRECHT L W, CLAUS B, TILMANN L, et al. Stimulation of CD95 (Fas) blocks T lymphocyte calcium channels through sphingomyelinase and sphingolipids [J]. *PNAS*, 1999, 96(24):13795 - 13800.
- [12] ZHU X F, LIU Z C, XIE B F, et al. Ceramide induces cell cycle arrest and upregulates p27kip in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Cancer Letters*, 2003, 193(2):149 - 154.
- [13] EUN H A, JOSEPH J S. Sphingoid bases and ceramide induce apoptosis in HT-29 and HCT-116 human colon cancer cells [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2002, 227(5):345 - 353.

[责任编辑:朱颖嫒]